

MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):

(19) 【発行国】 日本国特許庁 (J P)	(19)[ISSUING COUNTRY] Japan Patent Office (JP)
(12) 【公報種別】 公開特許公報 (A)	(12)[GAZETTE CATEGORY] Laid-open Kokai Patent (A)
(11) 【公開番号】 特開平 8-165248	(11)[KOKAI NUMBER] Unexamined Japanese Patent Heisei 8-165248
(43) 【公開日】 平成 8 年 (1 9 9 6) 6 月 2 5 日	(43)[DATE OF FIRST PUBLICATION] June 25, Heisei 8 (1996. 6.25)
(54) 【発明の名称】 エンドトキシンによる炎症の抑止剤	(54)[TITLE OF THE INVENTION] The suppressing agent of the inflammation by an endotoxin
(51) 【国際特許分類第 6 版】 A61K 38/16 38/00 ABE	(51)[IPC INT. CL. 6] A61K 38/16 38/00 ABE
【 F I 】 A61K 37/14 37/02 ABE	[FI] A61K 37/14 37/02 ABE
【審査請求】 未請求	[REQUEST FOR EXAMINATION] No
【請求項の数】 4	[NUMBER OF CLAIMS] 4
【出願形態】 O L	[FORM OF APPLICATION] Electronic
【全頁数】 8	[NUMBER OF PAGES] 8

(21) 【出願番号】
特願平 6-311963

(21)[APPLICATION NUMBER]
Japanese Patent Application Heisei
6-311963

(22) 【出願日】
平成 6 年 (1 9 9 4) 1 2 月 1 5 日

(22)[DATE OF FILING]
December 15, Heisei 6 (1994. 12.15)

(71) 【出願人】

(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

【識別番号】
594204734

[ID CODE]
594204734

【氏名又は名称】
栗岩 信夫

[NAME OR APPELLATION]
KURIIWA, Nobuo

【住所又は居所】
神奈川県座間市東原 5 - 1 - 1 5 -
1 0 1 さがみ野さくら

[ADDRESS OR DOMICILE]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】
栗岩 信夫

[NAME OR APPELLATION]
KURIIWA, Nobuo

【住所又は居所】
神奈川県座間市東原 5 - 1 - 1 5 -
1 0 1 さがみ野さくら

[ADDRESS OR DOMICILE]

(74) 【代理人】

(74)[AGENT]

【弁理士】

[PATENT ATTORNEY]

【氏名又は名称】
西澤 利夫

[NAME OR APPELLATION]
NISHISAWA, Toshio

(57) 【要約】**【構成】**

ラクトフェリン由来であって、分子量10,000ダルトン以下のペプチドを有効成分とするエンドトキシンによる炎症の抑止剤。

【効果】

この発明の有効成分であるペプチドは、免疫系細胞からのエンドトキシン誘導性サイトカインの放出、例えばヒト単球からのエンドトキシン刺激によるインターロイキン-6の放出を阻止する活性を有するので、エンドトキシンによる炎症の抑止に有効であり、0.5から50ppmの範囲の低濃度で効果を示し、グラム陰性菌感染時のヒトおよび動物におけるサイトカインを介する急性炎症、敗血症等のエンドトキシンによる有害な身体への作用を防止し、その治療に有効である。

【特許請求の範囲】**【請求項1】**

ラクトフェリン由来であって、分子量10,000ダルトン以下のペプチドを有効成分とするエンドトキシンによる炎症の抑止剤。

(57)[ABSTRACT OF THE DISCLOSURE]**[CONSTITUTION]**

It is lactoferrin-derived, comprised such that the suppressing agent of the inflammation by the endotoxin which contains the peptide of 10,000 or less Dalton of molecular weight as an active ingredient.

[ADVANTAGE]

The peptide which is the active ingredient of this invention has activity which prevents release of the endotoxin inducing cytokine from an immune-system cell, for example, release of the interleukin-6 by the endotoxin stimulation from a human monocyte. Therefore, it is effective in a restriction of the inflammation by an endotoxin. Effect is shown by the low concentration of the range of 0.5 to 50 ppm, the effect to the harmful body by endotoxins which intervene the cytokine in the human and animal at the time of a Gram-negative-bacteria infection, such as acute inflammation and sepsis, is prevented, it is effective in the treatment.

[CLAIMS]**[CLAIM 1]**

It is lactoferrin-derived, comprised such that the suppressing agent of the inflammation by the endotoxin which contains the peptide of 10,000 or less

Dalton of molecular weight as an active ingredient.

【請求項 2】

エンドトキシンによる炎症の抑止が、少なくとも単球からのエンドトキシン誘導性インターロイキン-6の放出阻止である請求項1のエンドトキシンによる炎症の抑止剤。

[CLAIM 2]

The suppressing agent of the inflammation by the endotoxin of Claim 1 whose restriction of the inflammation by an endotoxin is release prevention of the endotoxin inducing interleukin- 6 from an at least monocyte.

【請求項 3】

ペプチドが、ラクトフェリンのN末端領域から得られたペプチドである請求項1または2のエンドキシンによる炎症の抑止剤。

[CLAIM 3]

The suppressing agent of the inflammation by the endotoxin of Claim 1 or 2 whose peptide is a peptide obtained from N terminal region of a lactoferrin.

【請求項 4】

ペプチドが、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する請求項1ないし請求項3のいずれかのエンドトキシンによる炎症の抑止剤。

[CLAIM 4]

The suppressing agent of the inflammation by the endotoxin in any one of Claim 1 thru Claim 3 in which a peptide has the amino acid sequence of sequence number 1.

【発明の詳細な説明】**[DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION]****【0001】****[0001]****【産業上の利用分野】**

この発明は、ラクトフェリン由来のペプチドを有効成分とするエンドトキシンによる炎症の抑止剤に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、免疫系細胞からのエンドトキシン誘導性サイトカインの放出

[INDUSTRIAL APPLICATION]

This invention is related to the suppressing agent of the inflammation by the endotoxin which contains the peptide derived from a lactoferrin as an active ingredient.

In more detail, by restricting release (for example, release of the interleukin- 6 from

(例えば、単球からのインターロイキン-6の放出)を抑止することにより、サイトカインを介した急性炎症等のエンドトキシンの有害な生理作用から生体を防御することができ、例えばグラム陰性菌によるヒトおよび動物の敗血症等の予防および治療に有効な新しい炎症抑止剤に関するものである。

【0002】**【従来の技術】**

全てのグラム陰性菌の細胞壁の構成成分であるエンドトキシン(リポポリサッカライド)は、グラム陰性菌感染症において生体と相互作用する主要な成分の一つである。ヒトおよび動物の免疫系は、エンドトキシンと、エンドトキシンへの生体反応として惹起される多くの病理学的現象に対して非常に敏感であり、例えば免疫系細胞の一つである単球は、エンドトキシンへの生体反応を仲介するのに重要な役割を果たしていることが知られている [アドバンシズ・イン・イミュノロジー(Advances in Immunology)、第53巻、第267～289ページ、1993年]。

【0003】

単球は、ピコモラー濃度(またはそれ以上)のエンドトキシンに反応して炎症メディエーター [例えば、イ

a monocyte) of the endotoxin inducing cytokine from an immune-system cell, this invention can defend organism from the harmful physiological function of endotoxins, such as acute inflammation, via cytokine, for example, relates it to a new inflammation suppressing agent effective in prevention and the treatment of the sepsis of the human by Gram-negative bacteria, and an animal etc.

[0002]**[PRIOR ART]**

The endotoxin (lipopolysaccharide) which is the structural component of the cell wall of all Gram-negative bacteria is one of the main components which interacts with organism in the Gram-negative-bacteria infectious disease. The immune system of a human and an animal is an endotoxin, it is very sensitive with respect to many pathological phenomena induced as a vital reaction to an endotoxin. For example, having achieved the important role, although the monocyte which is one of an immune-system cell mediates the vital reaction to an endotoxin is known [Advances in immunology (Advances in Immunology), Volume 53, 267-289 page, 1993].

[0003]

A monocyte reacts with the endotoxin of a pico molar concentration (or more), and releases the cytokine which is an



ンターロイキン (インターロイキン-1、インターロイキン-6、インターロイキン-8)、TNF等] であるサイトカインを放出する。これらの炎症メディエーターは、炎症反応における生体機能の調節および感染に対する生体防御において中心的な役割を果たしている [アニュアル・レビューズ・オブ・バイオケミストリー (Annual Reviews of Biochemistry)、第59巻、第783～836ページ、1990年]。

【0004】

エンドトキシンに反応して単球から放出される炎症メディエーターの中で、インターロイキン-6は、他のサイトカインとともに免疫系の各種細胞の増殖、分化、活性に影響を与えている [アドバンシズ・イン・イミュノロジー (Advances in Immunology)、第54巻、第1～78ページ、1993年] が、炎症反応および細菌感染への生体防御を制御する複雑なネットワークの構成因子としても作用している。

【0005】

インターロイキン-6は、エンドトキシンにより誘導されるサイトカイン依存性急性炎症を阻害する内因性の調節機構の構成因子である。インターロイキン-6に対する抗体は、致死量の大腸菌に感染したマウスおよび致死量のTNFを投与されたマウスの死亡率を低下させることが知

inflammation mediator [for example, interleukin (interleukin-1, interleukin-6, interleukin-8), TNF, etc.].

These inflammation mediators have played the central role in the biophylaxis with respect to adjustment and an infection of the biological function in an inflammatory reaction [annual reviews of biochemistry (Annual Reviews of Biochemistry), Volume 59, 783-836 page, 1990].

[0004]

In the inflammation mediator which reacts with an endotoxin and is released from a monocyte, the interleukin-6 is effected in [Advances in immunology (Advances in Immunology), Volume 54, 1st to 78th page, 1993] also as a structure factor of the complicated network which controls the biophylaxis to an inflammatory reaction and a bacterial infection, although proliferation of the various cell of an immune system, a differentiation, and activity are affected with another cytokine.

[0005]

An interleukin-6 is the structure factor of the endogenous adjustment mechanism which inhibits the cytokine dependent acute inflammation induced by the endotoxin.

It is known that the antibody with respect to an interleukin-6 makes the mortality rate of the mouse which has administered TNF of



られている [ジャーナル・オブ・イミューノロジー (Journal of Immunology) 、第145巻、第4185～4191ページ、1990年]。この結果は、インターロイキン-6の活性の抑制が、エンドトキシンによる急性炎症を予防できることを示唆している。

【0006】

敗血症は、不可逆性低血圧、多臓器機能不全等の死亡の主要な原因となる重篤、かつ致命的な感染合併症である [ザ・ランセット(The Lancet)、第338巻、第732～736ページ、1991年] が、エンドトキシンはグラム陰性菌感染症における敗血症の主要なメディエーターとして広く知られている。敗血症の症状はエンドトキシンに対する生体反応として惹起され、精製したリポポリサッカライドを注射した動物モデルでも再現することができる。また、エンドトキシンに対する抗体は、グラム陰性菌による敗血症患者の死亡率を低下し得ることが知られている [ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン(New England Journal of Medicine) 、第324巻、第429～435ページ、1991年] が、このような抗体の使用もエンドトキシンショックに対しては必ずしも有効な手段ではなく、その予防および治療は依然として臨床上の重要な問題となっている。

the mouse infected with E. coli of a lethal dose and a lethal dose reduce [journal of immunology (Journal of Immunology), Volume 145, 4185-4191 page, 1990]. This result has suggested that suppression of activity of an interleukin-6 can prevent the acute inflammation by an endotoxin.

[0006]

Although the sepsis is serious and fatal infection complication constituting the main causes of death, such as irreversible hypotonia and multi-organ dysfunction, the endotoxin is widely known as main mediators of the sepsis in the Gram-negative-bacteria infectious disease in [THE lancet (The Lancet), Volume 338, 732-736 page, 1991].

The symptom of the sepsis is induced as a vital reaction with respect to an endotoxin, the animal model which injected with the purified lipopolysaccharide is also reproducible.

Moreover, although it is known that the antibody with respect to an endotoxin can reduce the mortality rate of the sepsis patient by Gram-negative bacteria, not the means with respect to the endotoxin shock also with always effective use but the prevention and the treatment of such an antibody still consist an important problem of clinical in [new England journal of medicine (New England Journal of Medicine), Volume 324, 429-435 page, 1991].

【 0 0 0 7 】

一方、ラクトフェリンは、哺乳類の種々の体液、乳、唾液、粘液性分泌物中に存在する分子量約 80,000 ダルトンの鉄結合性糖蛋白であり、炎症反応で活性化された好中球から放出されるが、エンドトキシンと直接結合することが知られている [インфекション・アンド・イミューニティー(Infection and Immunity)、第 62 巻、第 2628～2632 ページ、1994 年]。致死量の大腸菌に感染したマウスは、ウシラクトフェリンを静注することにより死亡率が減少する [ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・エクスピリメンタル・パソロジー (British Journal of Experimental Pathology)、第 70 巻、第 697～704 ページ、1989 年]。このグラム陰性菌敗血症の実験モデルで、死亡率を低下させるラクトフェリンの活性は、エンドトキシンへの免疫細胞の応答を調節する能力に起因するものと考えられている。

【 0 0 0 8 】

ラクトフェリンは、インターロイキン-1、TNF 等のサイトカインがエンドトキシンによって生体内のヒト単球から放出されるのを抑止することが知られている [ブラッド (Blood)、第 80 巻、第 235～240 ページ、1992 年]。エンドトキシン注入の 24 時間前にマウスに

[0007]

On the other hand, a lactoferrin is the iron binding glycoprotein of molecular weight about 80,000 Dalton which exists in a mammalian various bodily fluid, milk, a saliva, and a viscous-liquid-type secretion. It releases from the neutrophil activated by the inflammatory reaction.

However, directly bonding with an endotoxin is known [infection and immunity (Infection and Immunity), Volume 62, 2628-2632 page, 1994].

When the mouse infected with E. coli of a lethal dose carries out the intravenous administration of the cow lactoferrin, mortality rate decreases [British journal of Experimental pathology (British Journal of Experimental Pathology), Volume 70, 697-704 page, 1989].

It is thought that activity of the lactoferrin to which mortality rate is made to reduce with the experiment model of this Gram-negative-bacteria sepsis originates in the capability to control a response of the immunocyte to an endotoxin.

[0008]

It is known that a lactoferrin will restrict that cytokine, such as an interleukin- 1 and TNF, is released by the endotoxin from a human monocyte in the living body [blood (Blood), Volume 80, 235-240 page, 1992]. The intravenous administration of the cow lactoferrin was carried out to mouse 24 hours before endotoxin pouring.

ウシラクトフェリンを静注した結果、エンドトキシンにより誘導されるTNFおよびインターロイキン-6の血清中濃度の上昇を阻害したことが報告されている[インターナショナル・ジャーナル・オブ・エキスピリメンタル・パソロジー (International Journal of Experimental Pathology)、第74巻、第433～439ページ、1993年]。このメカニズムは十分解明されていないが、ラクトフェリンが直接エンドトキシンに結合することにより、全身性の反応を阻害しているものと考えられている。また、ラクトフェリン（特に金属結合ラクトフェリン）をエンドトキシンの毒性作用の治療に使用することも知られている（特開表5-501416号公報）。

As a result, having inhibited the raise of TNF induced by the endotoxin and the blood serum intermediate concentration of an interleukin- 6 is reported [International journal of Experimental pathology (International Journal of Experimental Pathology), Volume 74, 433-439 page, 1993].

This mechanism is not elucidated sufficiently.

However, when a lactoferrin binds with a direct endotoxin, it is thought that systemic reaction is inhibited.

Moreover, using a lactoferrin (in particular metallic-bond lactoferrin) for the treatment of the toxic effect of an endotoxin is also known (Unexamined-Japanese-Patent Table 5- 501416 number gazette).

【0009】

【発明が解決しようとする課題】
 グラム陰性菌敗血症は、これまでにいくつかの予防および治療の手段が存在するにもかかわらず、そのエンドトキシンショックによる高い死亡率が臨床上の重大な問題となっている。このため、グラム陰性菌敗血症における重篤な全身性反応から患者を守ることでできる効果的な新しい手段が待望されていた。また、このような事情は、エンドトキシン誘導性サイトカインの単球からの放出に起因する他の炎症性疾患についても

[0009]

[PROBLEM TO BE SOLVED BY THE INVENTION]

The Gram-negative-bacteria sepsis consists a problem on clinical with the high serious mortality rate by the endotoxin shock, although some prevention and the means of a treatment exist until now.

For this reason, it looked forward to an effective new means by which a patient can be protected from serious systemic reaction in the Gram-negative-bacteria sepsis. Moreover, such a situation is the same also about another inflammatory

同様である。

disease which originates in release from the monocyte of endotoxin inducing cytokine.

【 0 0 1 0 】

この発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、エンドトキシン誘導性サイトカインのヒト単球からの放出を阻害する新しい炎症抑止剤を提供することを目的としている。

[0010]

This invention was comprised in view of the situation as above.

It aims at providing the new inflammation suppressing agent which inhibits release from the human monocyte of endotoxin inducing cytokine.

【 0 0 1 1 】

【課題を解決するための手段】

この発明の発明者らは、免疫細胞からのエンドトキシン誘導性サイトカインの放出に対する、ラクトフェリン由来のペプチドの効果を初めて発見した。驚くべきことに、この発明の発明者らはラクトフェリンのN末端領域から得られた特定のペプチド [バイオキミカ・エト・ビオフィジカ・アクタ (Biochimica et Biophysica Acta)、第1121巻、第130～136ページ、1992年] が、エンドトキシン誘導性サイトカインのヒト単球からの放出（例えば、インターロイキンの放出）を阻止する優れた活性を有し、これによりエンドトキシンによるサイトカイン誘導性急性炎症等の有害な生体反応を防御するのに有用であることを見出し、この発明を完成した。なお、このようなペプチドは、リポポリサッカライドと結合することは知られて

[0011]

[MEANS TO SOLVE THE PROBLEM]

The inventors of this invention discovered the effect of the peptide derived from a lactoferrin with respect to release of the endotoxin inducing cytokine from an immunocyte for the first time.

Surprisingly, the inventors of this invention have outstanding activity in which the specific peptide [bio chimica et biophysica acta (Biochimica et Biophysica Acta), Volume 1121, 130-136 page, 1992] obtained from N terminal region of a lactoferrin prevents release (for example, release of an interleukin) from the human monocyte of endotoxin inducing cytokine, it finds out that it is useful for this defending harmful vital reactions, such as cytokine inducing acute inflammation by an endotoxin, this invention was perfected.

In addition, such a peptide is not conventionally known restricting release of the cytokine by an endotoxin in [infection



いるが[インフェクション・アンド・イミュニティー (Infection and Immunity)、第61巻、第719～728ページ、1992年]、エンドトキシンによるサイトカインの放出を抑止することは従来知られていない。

【0012】

すなわち、この発明は、前記の課題を解決するものとして、ラクトフェリン由来であって、分子量10,000ダルトン以下のペプチドを有効成分とするエンドトキシンによる炎症の抑止剤を提供する。また、この発明においては、エンドトキシンによる炎症の抑止が、少なくとも単球からのエンドトキシン誘導性インターロイキン-6放出の阻害であること、ペプチドがラクトフェリンのN末端領域から得られたペプチドであること、そしてこのペプチドが配列番号1に記載のアミノ酸配列を有することを望ましい態様としてもいる。

【0013】

以下、この発明について詳しく説明する。この発明の炎症抑止剤に使用する分子量10,000ダルトン以下のラクトフェリン由来のペプチドは、ラクトフェリンの加水分解、または常法のペプチド合成法により製造され、精製される。例えば、特開平5-92994号または特開平5-238948号に開示されている

and immunity (Infection and Immunity), Volume 61, 719-728 page, 1992], although bonding with the lipopolysaccharide is known.

[0012]

Namely, this invention is of lactoferrin origin as what solves said task, comprised such that the suppressing agent of the inflammation by the endotoxin which contains the peptide of 10,000 or less Dalton of molecular weight as an active ingredient is provided.

Moreover, in this invention, it requires also as a desirable aspect that a restriction of the inflammation by an endotoxin is inhibition of endotoxin inducing interleukin-6 release from an at least monocyte, that a peptide is a peptide obtained from N terminal region of a lactoferrin, and that this peptide has the amino acid sequence of sequence number 1.

[0013]

Hereafter, this invention is demonstrated in detail.

The peptide derived from the lactoferrin of 10,000 or less Dalton of molecular weight used to the inflammation suppressing agent of this invention is manufactured by hydrolysis of a lactoferrin, or the peptide synthesis method of a conventional method, it is purified.



方法を望ましい方法として推奨できる。さらに、各種の哺乳動物のラクトフェリンが高いホモロジーのアミノ酸配列を有することが知られているので、実質的にこのペプチドのアミノ酸配列を有し、エンドトキシン阻害活性を失わないアミノ酸残基の軽微な置換、付加および／または削除を行った他のペプチドもこの発明に使用できることは自明であり、それらはヒト、スイギュウ、ヒツジ、ヤギ等の動物のラクトフェリンの加水分解によっても製造することができる。具体的には、配列番号1の記載のアミノ酸配列を有する分子量3,100ダルトンのペプチドを示すことができ、分子量の下限が約500ダルトンまでのペプチドを好適な例として示すことができる。

【0014】

また、実質的にこのペプチドのアミノ酸配列を有し、エンドトキシン阻害活性を失わないアミノ酸残基の軽微な置換、付加、削除、および／または軽微な化学的修飾を行った他のペプチドを、常法のペプチド合成法により製造し得ることも自明である。さらに、前記ペプチドの薬学的に許容される塩類（例えば、塩酸塩、リン酸塩、硫酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、酒石酸塩等の酸付加塩等）、誘

For example, the method currently disclosed by Unexamined Japanese Patent No. 5-92994 or 5-238948 can be recommended as a desirable method.

Furthermore, it is known that the lactoferrin of various mammal has the amino acid sequence of a high homology.

Therefore, it substantially has the amino acid sequence of this peptide, it is obvious that another peptide which performed the light substitution, addition, and/or deletion of the amino acid residue which does not lose an endotoxin inhibition activity can also be used to this invention. They can be manufactured also by hydrolysis of the lactoferrin of animals, such as a human, water buffalo, a sheep, and a goat. The peptide of molecular weight 3,100 Dalton which has the amino acid sequence of description of sequence number 1 can be illustrated specifically, and the minimum of molecular weight can show the peptide to about 500 Dalton as a suitable example.

[0014]

Moreover, it substantially has the amino acid sequence of this peptide, it is also obvious that another peptide which performed the light substitution of the amino acid residue which does not lose an endotoxin inhibition activity, addition, deletion, and/or a light chemical modification can be manufactured with the peptide synthesis method of a conventional method. Furthermore, pharmacologically acceptable salts of said

導体（例えば、カルボキシル基のアミド化、アミノ基のアセチル化等）もこの発明の炎症抑止剤の有効成分として使用することができる。

peptide (for example, acid-added salts, such as hydrochloride, a phosphate, a sulfate, a citrate, lactate, and tartrate etc.), also derivatives (for example, an amidation of a carboxyl group, an acetylation of an amino group, etc.), the inflammation suppressing agent of this invention can contain as an active ingredient and it can use.

【0015】

この発明の炎症抑止剤に用いるペプチドは、エンドトキシン阻害活性を有し、少なくとも単球からのエンドトキシン誘導性のインターロイキン-6の放出阻害活性を有している。このペプチドの有用な活性は、例えばこの明細書の後記の方法（試験例1～3参照）により容易に検証することができる。免疫系細胞から、エンドトキシン誘導性インターロイキン-6等のサイトカインの放出を阻止することにより、このペプチドは炎症反応を減少させ、エンドトキシンによる有害な身体反応、例えば、ヒトおよび動物のグラム陰性菌感染時における急性炎症を防止することができる。このような活性は、特にヒトおよび動物のグラム陰性菌感染時の敗血性ショックを防御し、治療するのに有効である。また、このペプチドは、試験例4に示すように極めて毒性が低く、安全である。

[0015]

The peptide used for the inflammation suppressing agent of this invention has an endotoxin inhibition activity, it has the release inhibition activity of the interleukin-6 of endotoxin inductivity from an at least monocyte. Useful activity of this peptide is easily verifiable by the method (Experiment 1-3 reference) of the postscript of this specification, for example. This peptide decreases an inflammatory reaction by preventing release of the cytokine of endotoxin inducing interleukin-6 grade from an immune-system cell. The acute inflammation at the time of a Gram-negative-bacteria infection of harmful body reaction by an endotoxin, for example, a human, and an animal can be prevented. In particular, such activity defends the septic shock at the time of a Gram-negative-bacteria infection of a human and an animal, it is effective in treating. Moreover, this peptide has very low toxicity as shown in Experiment 4, and is safe.

【0016】

この発明の炎症抑止剤は、試験例1～試験例3から明らかなように、その有効成分であるペプチドを少なくとも0.5 ppm、望ましくは5から50 ppmの濃度で含有している。また、この発明の炎症抑止剤は、薬理学的に許容される公知の適当な溶媒（例えば水、エタノール、グリセロール、プロピレングリコール、液状ポリエチレングリコール等）、香料、甘味料、結合剤、等張性物質、塗布剤、界面活性剤、吸収遅延剤等と併用することもできる。さらに、他のエンドトキシンによる炎症の抑止に有効な成分〔例えば、コルチコステロイド（メチルプレドニゾロン、デキサメタゾン等）、抗生物質（アンピシリン、メチシリン、バンコマイシン等）、抗体（抗エンドトキシン抗体、抗インターロイキン-6抗体、抗TNF抗体等）等〕もまたこの発明の炎症抑止剤に添加することもできる。もちろん使用する物質は、使用する濃度において無毒でなければならないことは自明のことである。

【0017】

この発明の炎症抑止剤は、ヒトおよび動物に、例えば皮膚、眼、耳、鼻、肛門、膣に、粉末、溶液、懸濁液、クリーム、軟膏、スプレーとして、また非経口的に、腹腔内または筋肉

[0016]

The inflammation suppressing agent of this invention is at least 0.5 ppm clearly from Experiment 1-Experiment 3 about the peptide which is that active ingredient, it contains by the concentration of 5 to 50 ppm desirably. Moreover, the inflammation suppressing agent of this invention can also be used together with the suitable well-known solvent (for example, water, ethanol, a glycerol, a propylene glycol, liquid polyethyleneglycol, etc.) accepted pharmacologically, flavor, sweetener, binder, an isosmotic substance, coating agent, a surfactant, an absorption retarder, etc. Furthermore, a component [for example, corticosteroids (the methylprednisolone, dexamethasone, etc.), antibiotics (an ampicillin, a methicillin, vancomycin, etc.), antibodies, etc. (anti-endotoxin antibody, anti-interleukin-6 antibody, anti-TNF antibody, etc.)] effective in a restriction of the inflammation by another endotoxin can also be added to the inflammation suppressing agent of this invention. It is an obvious thing that the substance used, of course must be nonpoisonous in the concentration to be used.

[0017]

The inflammation suppressing agent of this invention can be administered to the skin, eyes, an ear, a nose, the anus, and the vagina as a powder, a solution, a suspension, cream, the ointment, and

内等は無菌注射溶液として投与することができる。また、この発明の炎症抑止剤は、経口的に、例えば粉末、溶液、カプセル、錠剤、シロップ、チンキ、または直接食品として投与することもできる。

【0018】

この発明の炎症抑止剤は、例えば、医薬品（目薬、乳腺炎薬等）、医薬部外品（洗口剤等）、化粧品（スキンローション等）、食品（チュウインガム等）としての摂取、エンドトキシンの阻害活性が必要とされる製品（外科用衣服、包帯等）への混合、噴霧、付着、塗布、注入、エンドトキシン阻害活性が必要とされるあらゆる製品の処理に使用される。

【0019】

次に試験例を示してこの発明をさらに詳しく説明する。なお、以下の説明において、百分率の表示は特に断りのない限り重量による値である。

【試験例1】

この試験は、この発明の炎症抑止剤に用いるペプチドを、細胞のリボポリサッカライドによる刺激前に添加

spray, and can administer it to a human and an animal as an aseptic injection solution parenterally at the inside of an abdominal cavity, or an intramuscular.

Moreover, the inflammation suppressing agent of this invention can also be orally administered as a powder, a solution, a capsule, a tablet, sirup, tincture, or direct foodstuffs.

[0018]

The inflammation suppressing agent of this invention is used by processing of all the products with which the ingestion as pharmaceuticals (eyedrops, mastitis drug, etc.), quasi-drugs (mouthwash etc.), cosmetics (skin lotion etc.), and foodstuffs (chewing gum etc.), mixing to the products (clothes for surgery, bandage, etc.) with which the inhibition activity of an endotoxin is required, a spraying, adhesion, an application, pouring, and an endotoxin inhibition activity are required.

[0019]

Next, an EXPERIMENT is shown and, in more detail, this invention is demonstrated. In addition, it sets to the following description, the display of a percentage is a value by a weight unless there is particular notice.

[EXPERIMENT 1]

When this test adds the peptide used for the inflammation suppressing agent of this invention before the stimulus by the



したときの、ヒト単球からのエンドトキシン誘導性インターロイキン-6の放出阻害活性を調べるために行った。

1) 試料の調製

E. coli 0127から精製したエンドトキシン (リポポリサッカライド。シグマ・ケミカル社製)、ヒトラクトフェリン (シグマ社製)、ウシラクトフェリン (森永乳業社製) および参考例1と同一の方法により製造したペプチドを、パイロジェン・フリーの水に溶解し、エンドトキシン吸収ゲル (大洋漁業社製。カツクリン-D) と混合し、一晩インキュベイトし、ゲルを遠心により除去した。この処理後、これらの物質のエンドトキシン量を、リムルス・アッセイ (クロモジェニックス社製) により測定した。ヒトラクトフェリンは12~36 EU/mg (リポポリサッカライド約1~3 ng/mgに相当する)、ウシラクトフェリンは72 EU/mg、ペプチドは2.4 EU/mg以下であった。なお、1 EUは、リムルス・アッセイにおいてアメリカ薬局方の標準物質の1単位に相当する活性を有するエンドトキシンの量である。

2) 試験方法

ヒト単球セル・ライン、THP-1細胞 (アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション No. ATCC-TIB202) を、10%熱処理ウシ胎児血清とβ-メルカプトエタノールを加えたRPMI-1640

lipopolysaccharide of a cell, it was carried out, in order to investigate the release inhibition activity of the endotoxin inducing interleukin-6 from a human monocyte.

1) Preparation of a sample

The endotoxin purified from E.coli 0127 (lipopolysaccharide, made by Sigma chemical company), a human lactoferrin (made by Sigma company), a cow lactoferrin (made by Morinaga Milk Industry Co., Ltd.) And the peptide manufactured by the same method as Reference Example 1 is dissolved in pyrogen free water, it dissolves in pyrogen free water, it mixes with an endotoxin absorption gel (the Taiyo Fishery Co., Ltd. make, Guts Clean-D), it incubates overnight, centrifugation removed the gel. The amount of endotoxins of these substances was measured by a limulus assay (made by Clomogenix) after this processing. As for the human lactoferrin, 72 EU/mg and the peptide of 12-36 EU/mg (it is equivalent to about 1 to 3 ng/mg of lipopolysaccharides) and a cow lactoferrin were 2.4 or less EU/mg. In addition, 1EU is the quantity of the endotoxin which has activity which corresponds to 1 unit of the standard substance of a United States Pharmacopoeia in a limulus assay.

2) Test method

A human monocyte cell line and THP-1 cell (American type culture collection No.ATCC-TIB202) are cultured by RPMI-1640 culture medium (made by Sigma company) which added the heat



培地（シグマ社製）で培養し、対数増殖期の細胞を1500 rpm、10分の遠心で洗浄し、分離した。リポポリサッカライドによる刺激は、24穴プレート（ヌンク社製）上で新鮮な完全培地（RPMI-1640、5%熱処理ウシ胎児血清、1%ゲンタマイシン）を用いて20～24時間、37℃で行った。

processing fetal calf serum and the (beta)-mercaptoethanol 10%, the cell of a logarithmic growth phase is washed by 1500 rpm and the centrifugation for 10 minutes, it isolated. The stimulation by a lipopolysaccharide was performed at 37 degrees C for 20 to 24 hours using the fresh complete medium (a RPMI-1640, 5% heat processing fetal calf serum, 1% gentamycin) on the 24 wells plate (made by a Nunc Co.,).

【0020】

細胞密度を、 1×10^6 細胞/mlに調整し、エンドトキシンの刺激への感受性を高めるために、 γ -インターフェロン200 U/ml（単位は後記する）で実験開始の16時間前に前処理した。ヒトラクトフェリン、ウシラクトフェリン、またはペプチドを、それぞれ5 μ g/mlの濃度でE. coli 0127由来のリポポリサッカライドによる刺激の30分前に添加し、培地を400 G、4℃で、10分間遠心し、得られた上清をサイトカイン量アッセイまで-20℃で保存した。

[0020]

A cell density is adjusted to a 1×10^6 cell / ml, in order to raise the sensitivity to the stimulation of an endotoxin, it pretreated 16 hours before the experiment start by (gamma)- interferon 200 U/ml (a unit is below-mentioned). A human lactoferrin, a cow lactoferrin, or a peptide is each added 30 minutes before the stimulation by the lipopolysaccharide derived from E.coli 0127 by the concentration of 5 microgram/ml, a culture medium is centrifuged to 10 minutes at 400G and 4 degrees C, the obtained supernatant liquid was preserved at -20 degrees C to the amount assay of cytokine.

【0021】

インターロイキン-6のバイオアッセイを次のとおり行った。インターロイキン依存性の増殖をするセル・ラインB13.29のサブクローンを使用し、細胞を組織培養用プラスチックから回収し、1穴当たり5000細

[0021]

The bioassay of an interleukin- 6 was performed as follows. The subclone of cell line B13.29 which propagates an interleukin dependence is used, a cell is collected from the flask for tissue culture, it scattered on the micro titer

胞の濃度でマイクロタイタープレート（ヌンク社製）に播いた。1 : 50 または 1 : 250 に希釈した試料またはインターロイキン-6 の標準液を細胞に添加し、68 時間培養した。細胞を回収する 4 時間前に ^3H -チミジンを添加し、リポポリサッカライドの用量依存性インターロイキン-6 の放出を、ヒトインターロイキン-6 エライザキット（ハイサイト社製）を用いて定量した。なお、各検体について少なくとも 5 回反復して試験し、その平均値および標準偏差を算出した。

【0022】

なお、 γ -インターフェロン 1 U は世界保健機構の参照物質を標準として、FC 細胞におけるシンドビス・ウイルス誘導性の細胞変性効果を測定し、50% 防御する γ -インターフェロンの量である。

3) 試験結果

この試験の結果は、図 1 に示すとおりである。図 1 は、リポポリサッカライドの用量とインターロイキン-6 放出との関係を示し、縦軸および横軸は、それぞれインターロイキン-6 濃度およびリポポリサッカライド濃度を示す。図中○、●、▽および▼は、それぞれ無添加（対照）、ヒトラクトフェリン、ウシラクトフェリンおよびペプチドを示し、各シンの上下に伸びた棒は標準偏差を示す。

plate (made by a Nunc Co.,) by the concentration of 5000 cells per hole.

The standard solution of the sample diluted to 1:50 or 1:250 or an interleukin- 6 is added to a cell, it cultured for 68 hours.

4 hours before collecting a cell, ^3H -thymidine is added, release of the dosage dependent interleukin- 6 of a lipopolysaccharide was assayed using the human interleukin- 6 ELISA kit (made by High site company). In addition, about each test substance, it repeats at least 5 times and examines, the average value and standard deviation were calculated.

[0022]

In addition, (gamma)- interferon 1U makes the reference substance of the World Health Organization a standard, and the cytopathogenic effect of Sindbis virus inductivity in FC cell is measured, it is the quantity of the (gamma)- interferon defended 50%.

3) Test result

The result of this test is as showing in FIG. 1. FIG. 1 shows the relationship between the dosage of a lipopolysaccharide, and interleukin- 6 release, the vertical axis and a horizontal axis each show interleukin- 6 concentration and a lipopolysaccharide concentration. CIRCLE, BLACK CIRCLE, TRIANGLE, and REVERSE BLACK TRIANGLE each show additive-free (control), a human lactoferrin, a cow lactoferrin, and a peptide in the drawing(s), the rod extended to the upper and lower



sides of each symbol shows a standard deviation.

【0023】

図1から明らかなように、THP-1細胞からのリポポリサッカライド誘導性のインターロイキン-6放出が、リポポリサッカライドの用量10および100 ng/mlにおいて、対照ではそれぞれ約1200および約3000 U/mlであるのに対して、ヒトラクトフェリンではそれぞれ約500および約1600 U/ml、ウシラクトフェリンではそれぞれ約800および約500 U/mlであった。

[0023]

Interleukin-6 release of lipopolysaccharide inductivity from THP-1 cell sets in dosage of 10 and 100 ng/ml of a lipopolysaccharide clearly from FIG. 1, with respect to being each about 1200 and about 3000 U/ml in a control, at a human lactoferrin, they are each about 500 and about 1600 U/ml, in the cow lactoferrin, they were each about 800 and about 500 U/ml.

【0024】

一方、この発明に用いるペプチドは、リポポリサッカライドの用量10および100 ng/mlにおいて、それぞれ約200および400 U/mlであり、リポポリサッカライドの用量の増加によるインターロイキン-6の放出の増加がほとんど認められず、かつ100 ng/mlのリポポリサッカライドの用量におけるインターロイキン-6の放出が、対照の約1/8、ヒトラクトフェリンの約1/4およびウシラクトフェリンとほぼ同等であり、リポポリサッカライド誘導性のインターロイキン-6の放出が顕著に阻止されていることが判明した。なお、ペプチドの種類を変更して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

[0024]

On the other hand, the peptide used for this invention is set in dosage of 10 and 100 ng/ml of a lipopolysaccharide, they are each about 200 and 400 U/ml.

The increase in release of the interleukin-6 by the increase in the dosage of a lipopolysaccharide is hardly recognized, and release of the interleukin-6 in the dosage of a 100 ng/ml lipopolysaccharide is substantially equivalent to about 1/4 of about 1/8 of a control, and a human lactoferrin, and a cow lactoferrin.

It became clear that release of the interleukin-6 of lipopolysaccharide inductivity was prevented notably.

In addition, the kind of peptide was changed and examined. However, the substantially the same result was obtained.

【試験例 2】

この試験は、この発明に用いるペプチドをリポポリサッカライド刺激の後に添加したときの、ヒト単球からのエンドトキシン誘導性インターロイキン-6の放出阻害活性を調べるために行った。

1) 試料の調製

試料の調製は試験例 1 と同様に行った。

2) 試験方法

ヒトラクトフェリン、ウシラクトフェリンおよび試験例 1 と同一のペプチドを、リポポリサッカライド刺激の 30 分後に、それぞれ $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加したことを除き、試験例 1 と同一の方法で試験した。

3) 試験結果

この試験の結果は、図 2 に示すとおりである。図 2 は、リポポリサッカライドの用量とインターロイキン-6 放出との関係を示し、縦軸および横軸は、それぞれインターロイキン-6 濃度およびリポポリサッカライド濃度を示す。図中○、●、▽および▼は、それぞれ無添加（対照）、ヒトラクトフェリン、ウシラクトフェリンおよびペプチドを示し、各シンボルの上下に伸びた棒は標準偏差を示す。

【0025】
[EXPERIMENT 2]

When this test adds the peptide used for this invention after a lipopolysaccharide stimulation, it was carried out, in order to investigate the release inhibition activity of the endotoxin inducing interleukin-6 from a human monocyte.

1) Preparation of a sample

Preparation of a sample was performed like Experiment 1.

2) Test method

The same peptide as a human lactoferrin, a cow lactoferrin, and Experiment 1 was examined by the same method as Experiment 1 except for having each carried out 50 microgram/ml addition 30 minutes after the lipopolysaccharide stimulation.

3) Test result

The result of this test is as showing in FIG. 2. FIG. 2 shows the relationship between the dosage of a lipopolysaccharide, and interleukin-6 release, the vertical axis and a horizontal axis each show interleukin-6 concentration and a lipopolysaccharide concentration.

CIRCLE, BLACK CIRCLE, TRIANGLE, and REVERSE LACK TRIANGLE each show additive-free (control), a human lactoferrin, a cow lactoferrin, and a peptide in the drawing(s), the rod extended to the upper and lower sides of each symbol shows a standard deviation.

[0025]

図2から明らかなように、THP-1細胞からのリポポリサッカライド誘導性のインターロイキン-6放出が、リポポリサッカライドの用量10および100 ng/mlにおいて、対照ではそれぞれ約1800および約3400 U/mlであるのに対して、ヒトラクトフェリンではそれぞれ約600および約2000 U/ml、ウシラクトフェリンではそれぞれ約400および約1800 U/mlであった。

【0026】

一方、この発明に用いるペプチドは、リポポリサッカライドの用量10および100 ng/mlにおいて、いずれも約600 U/mlであり、リポポリサッカライドの用量の増加によるインターロイキン-6の放出の増加が認められず、かつ100 ng/mlのリポポリサッカライドの用量におけるインターロイキン-6の放出が、対照の約1/6、ヒトラクトフェリンおよびウシラクトフェリンの約1/3であり、リポポリサッカライド誘導性のインターロイキン-6の放出が顕著に阻止されていることが判明した。なお、ペプチドの種類を変更して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【試験例3】

この試験は、細菌細胞壁断片、細菌菌体および精製リポポリサッカライドの刺激によるヒト単球からのエン

Interleukin-6 release of lipopolysaccharide inductivity from THP-1 cell sets in dosage of 10 and 100 ng/ml of a lipopolysaccharide clearly from FIG. 2, with respect to being each about 1800 and about 3400 U/ml in a control, at a human lactoferrin, they are each about 600 and about 2000 U/ml, in the cow lactoferrin, they were each about 400 and about 1800 U/ml.

[0026]

On the other hand, the peptide used for this invention is set in dosage of 10 and 100 ng/ml of a lipopolysaccharide, all are about 600 U/ml.

The increase in release of the interleukin-6 by the increase in the dosage of a lipopolysaccharide is not recognized, and release of the interleukin-6 in the dosage of a 100 ng/ml lipopolysaccharide

It is about 1/3 of about 1/6 of a control, a human lactoferrin, and a cow lactoferrin.

It became clear that release of the interleukin-6 of lipopolysaccharide inductivity was prevented notably.

In addition, the kind of peptide was changed and examined. However, the substantially the same result was obtained.

[EXPERIMENT 3]

This test was performed in order to investigate activity in which the peptide used for this invention prevents endotoxin

ドトキシシン誘導性インターロイキン-6放出を、この発明に用いるペプチドが阻止する活性を調べるために行った。

1) 試料の調製

試料の調製は次のことを除いて試験1と同様に行った。

(1) 精製リポポリサッカライドの調製

E. coli 018K1を1%グルコースを含むニュートリエント・ブロス寒天培地(ディフコ社製)で37℃で培養し、集菌し、洗浄し、得られた菌体から熱フェノール水法[メソッズ・イン・カーボハイドレイト・ケミストリー(Methods in Carbohydrate Chemistry)、第5巻、第83ページ、1965年]により精製リポポリサッカライドを抽出した。

(2) 細菌細胞壁断片の調製

E. coli 018K1菌を最小基本培地で培養し、遠心分離し、上清を0.2μmメディカップ・フィルター(マイクロゴン社製)で濾過し、ウルトラセット・オメガ100K・メンブレン・フィルター(フィルترون社製)の限外濾過により濃縮し、無菌パイロジェン・フリー水で透析し、濃縮上清を凍結乾燥し、細菌細胞壁断片を得た。

(3) 細菌菌体の調製

前記(1)と同一の方法により得た菌体(生菌)を、試験に使用する前に2回洗浄した。

2) 試験方法

inducing interleukin-6 release from the human monocyte by the stimulation of a bacteria cell-wall fragments, bacteria microbial cells, and the purified lipopolysaccharide.

1) Preparation of a sample

Preparation of a sample was performed like Test 1 except for the following thing.

(1) Preparation of the purified lipopolysaccharide

E.coli 018K1 is cultured at 37 degrees C by the nutrient broth agar medium (made by Difco company) which contains glucose 1%, it collects microbes, it washes, the purified lipopolysaccharide was extracted from the obtained microbial cells by the heat phenol- water method [methods in carbo hydrate chemistry (Methods in Carbohydrate Chemistry), Volume 5, 83rd page, 1965].

(2) Preparation of a bacteria cell-wall fragments

E. coli 018K1 microbe by culturing minimum basal medium, it centrifuges, a supernatant liquid is filtered with a 0.2-micrometer medi cup filter (made by microgon), it concentrates with the ultrafiltration of ultra set omega 100K and a membrane filter (made by filtron company), it dialyzes with aseptic pyrogen free water, a concentration supernatant liquid is freeze-dried, the bacteria cell-wall fragments was obtained.

(3) Preparation of bacteria microbial cells

Before using to a test the microbial cells (living microbe) obtained by the same

細菌細胞壁断片、細菌菌体および精製リポポリサッカライドで細胞を刺激する30分前に0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

(0.5 ppm) のペプチドを添加したことを除き試験例1と同一の方法、および細菌細胞壁断片、細菌菌体および精製リポポリサッカライドで細胞を刺激した30分後に50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (50 ppm) のペプチドを添加したことを除き、試験例2と同一の方法により試験した。同時に対照としてペプチドを添加しないで同様に試験した。なお、各エンドトキシン含有調製物の濃度を、いずれも2 ng/ml のリポポリサッカライド量に調整した。また、各検体について少なくとも5回反復して試験し、その平均値を算出した。

3) 試験結果

この試験の結果は、図3に示すとおりである。図3は、細菌細胞壁断片、細菌菌体および精製リポポリサッカライドの刺激前後のペプチドの添加によるインターロイキン-6放出との関係を示し、縦軸および横軸は、それぞれインターロイキン-6濃度および試験群を示す。図中各試験群の第1列、第2列および第3列は、それぞれ無添加(対照)、刺激前添加および刺激後添加を示す。

method as said (1), they were washed twice.

2) Test method

30 minutes after stimulating a cell except for having added the peptide of 0.5 microgram/ml (0.5 ppm) by the same method as Experiment 1 and a bacteria cell-wall fragments, bacteria microbial cells, and the purified lipopolysaccharide 30 minutes before stimulating a cell by a bacteria cell-wall fragments, bacteria microbial cells, and the purified lipopolysaccharide, except for having added the peptide of 50 microgram/ml (50 ppm), it examined by the same method as Experiment 2. It examined similarly without adding a peptide as a control simultaneously. In addition, all adjusted the concentration of each endotoxin-containing preparation to the amount of lipopolysaccharides of 2 ng/ml . Moreover, about each test substance, it repeats at least 5 time and examines, the average value was calculated.

3) Test result

The result of this test is as showing in FIG. 3. FIG. 3 shows a relationship with interleukin-6 release by the addition of the peptide of the stimulus before and after of a bacteria cell-wall fragments, bacteria microbial cells, and the purified lipopolysaccharide, the vertical axis and a horizontal axis each show interleukin-6 concentration and a test group. The 1st row, 2nd row, and 3rd row of each test group each show additive-free (control),

stimulus pre-addition, and stimulus post-addition in the drawing(s).

【 0 0 2 7 】

図 3 から明らかなように、細菌細胞壁断片および精製リポポリサッカライドによる刺激群では、対照に比してインターロイキン-6 の放出は、ペプチドにより顕著に抑制されていることが認められた。特に、刺激後にペプチドを添加した場合には、その効果が顕著であった。これに対して細菌菌体による刺激群では、対照に比して刺激前にペプチドを添加した場合、インターロイキン-6 の放出は増加したが、刺激後にペプチドを添加した場合、ペプチドにより顕著に抑制されていることが認められた。刺激前にペプチドを添加した場合にインターロイキン-6 の放出が増加した理由は不明であるが、より実際の感染に近い生菌体の刺激においても、ペプチドが有効に作用することが認められた。

【 0 0 2 8 】

この試験および試験例 1 の結果から、ペプチドの有効量が、少なくとも 0.5 ppm、望ましくは 5 ~ 50 ppm、であることが判明した。なお、ペプチドの種類を変更して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

[0027]

In the stimulus group by the bacteria cell-wall fragments and the purified lipopolysaccharide, it was clearly recognized from FIG. 3 that release of an interleukin- 6 is notably suppressed with the peptide as compared with a control.

In particular, the effect was remarkable when a peptide was added after a stimulus. On the other hand, in the stimulus group by bacteria microbial cells, when a peptide was added before a stimulus as compared with a control, release of an interleukin- 6 increased.

However, when a peptide was added after a stimulus, suppressing notably with the peptide was recognized. When a peptide is added before a stimulus, the reason which release of an interleukin- 6 increased is unknown. However, it was recognized also in the stimulation of the living microbe body near a more nearly actual infection that a peptide acts effectively.

[0028]

The effective dose of the result of this test and Experiment 1 to a peptide is at least 0.5 ppm, it became clear that it was 5 - 50 ppm desirably. In addition, the kind of peptide was changed and examined.

However, the substantially the same result was obtained.

【試験例 4】

この試験は、この発明の炎症抑止剤に用いるペプチドの急性毒性を調べるために行った。

1) 試験動物

6 週齢の CD (SD) 系のラットの両性 (日本チャールス・リバー社から購入) を、無作為にそれぞれ 8 群 (1 群 5 匹) に分けた。

2) 試験方法

参考例 1 のペプチドを、注射用水 (大塚製薬社製) に溶解し、体重 1 kg 当たり 1000、2000 および 4000 mg の割合で、金属製玉付き針を用いて単回強制経口投与し、急性毒性を試験した。

3) 試験結果

この試験の結果、ペプチドを投与した全例ともに死亡例は認められなかった。従って、ペプチドの LD₅₀ は、4000 mg/kg 以上であることが判明した。なお、ペプチドの種類を変更して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

[EXPERIMENT 4]

This test was performed in order to investigate the acute toxicity of the peptide used for the inflammation suppressing agent of this invention.

1) Test animal

Both sexes (from a Japanese Charles-River company to purchasing) rat of 6 week-old CD (SD) type was each divided into 8 groups (5 per group) at random.

2) Test method

The peptide of Reference Example 1 is dissolved in water for injection (made by Otsuka Pharmaceutical), at a ratio of 1000, 2000, and 4000 mg, single time forced oral administration is carried out using a needle with a metal ball per body weight of 1kg, the acute toxicity was examined.

3) Test result

As for the example of death, all the examples that administered the result of this test and the peptide were not recognized. Therefore, it became clear that LD₅₀ of a peptide was 4000 mg/kg or more. In addition, the kind of peptide was changed and examined. However, the substantially the same result was obtained.

【参考例 1】

市販のウシ・ラクトフェリン (シグマ社製) 50 mg を精製水 0.9 ml に溶解し、0.1 規定の塩酸で pH を 2.5 に調整し、のち市販のブタペプシン (シグマ社製) 1 mg を添加し、37℃で6時間加水分解し

[REFERENCE 1]

Commercially available cow lactoferrin (made by Sigma company) 50 mg is dissolved in 0.9 ml of purified waters, PH is adjusted to 2.5 with hydrochloric acid of 0.1 N, the rest adds commercially available pig pepsin (made by Sigma company) 1 mg, it

た。次いで0.1規定の水酸化ナトリウムでpHを7.0に調整し、80℃で10分間加熱して酵素を失活させ、室温に冷却し、15,000rpmで30分間遠心分離し、透明な上清を得た。この上清100μlをTSKゲルODS-120T（東ソー社製）を用いた高速液体クロマトグラフィーにかけ、0.8ml／分の流速で試料注入後10分間0.05%TFA（トリフルオロ酢酸）を含む20%アセトニトリルで溶出し、のち30分間0.05%TFAを含む20～60%のアセトニトリルのグラジエントで溶出し、24～25分の間に溶出する画分を集め、真空乾燥した。この乾燥物を2%（W／V）の濃度で精製水に溶解し、再度TSKゲルODS-120T（東ソー社製）を用いた高速液体クロマトグラフィーにかけ、0.8ml／分の流速で試料注入後10分間0.05%TFAを含む24%アセトニトリルで溶出し、のち30分間0.05%TFAを含む24～32%のアセトニトリルのグラジエントで溶出し、33.5～35.5分の間に溶出する画分を集めた。前記の操作を25回反復し、真空乾燥し、ペプチド約1.5mgを得た。

hydrolyzed at 37 degrees C for 6 hours.

Subsequently, pH is adjusted to 7.0 by sodium hydroxide of 0.1 stipulation, ten minutes is heated at 80 degrees C, and an enzyme is made to deactivate.

It cools to room temperature, it centrifuges 30 minutes by 15,000 rpm, the transparent supernatant liquid was obtained.

100 microliter of this supernatant liquid is applied to the high performance liquid chromatography using TSK gel ODS-120T (made by Tosoh Corporation CORP.), and it is the 0.8 ml/min flow rate.

It elutes after sample pouring in 20% acetonitrile which contains TFA (trifluoroacetic acid) 0.05 % of 10 minutes, it elutes in the gradient of 20 to 60% of acetonitrile which contains TFA 0.05 % of after 30 minutes, the fraction eluted in 24 to 25 minutes was collected and vacuum-dried. This dried product is dissolved in a purified water by 2% (W/V) of concentration, it applies to the high performance liquid chromatography using TSK gel ODS-120T (made by Tosoh Corporation CORP.) again, after sample pouring in by the 0.8 ml/min flow rate, it elutes in 24% acetonitrile which contains TFA 0.05 % of 10 minutes, it elutes in the gradient of 24 to 32% of acetonitrile which contains TFA 0.05 % of after 30 minutes, the fractions eluted in 33.5 to 35.5 minutes were collected. Said operation is repeated 25 times, it vacuum-dries, peptide about 1.5 mg was obtained.

【0029】

前記のペプチドを6N塩酸で加水分解し、アミノ酸分析計を用いて常法によりアミノ酸組成を分析した。同一の試料を気相シーケンサー（アプライド・バイオシステムズ社製）を用いて25回のエドマン分解を行ない、25個のアミノ酸残基の配列を決定した。またDTNB [5, 5-ジチオービス（2-ニトロベンゾイック・アシド）]を用いたジスルフィド結合分析法 [アナリティカル・バイオケミストリー（Analytical Biochemistry）、第67巻、第493頁、1975年]によりジスルフィド結合が存在することを確認した。

【0030】

その結果、このペプチドは、25個のアミノ酸残基からなり、3番目と20番目のシステイン残基がジスルフィド結合し、3番目のシステイン残基からN-末端側に2個のアミノ酸残基が、20番目のシステイン残基からC-末端側に5個のアミノ酸が、それぞれ結合した、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有していることが確認された。

【参考例2】

ペプチド自動合成装置（ファルマシアLKBバイオテクノロジー社製。LKB BioLynx 4170）を用い、シェパード等による固相ペプチド合成法 [ジャーナル・オブ・ケ

[0029]

Said peptide is hydrolyzed with 6N hydrochloric acid, the amino acid composition was analyzed by the conventional method using the amino acid analyzer. 25 times of Edman degradations were performed for the same sample using the gaseous-phase sequencer (made by an applied Biosystems company), and the sequence of a 25 amino acid residue was determined.

Moreover, it confirmed that a disulfide bond existed with the disulfide-bond analysis [analytical biochemistry (Analytical Biochemistry), Volume 67, Page 493, 1975] using DTNB [5,5- dithio- bis (2-nitro benzoic acid)].

[0030]

As a result, this peptide consists of a 25 amino acid residue, the cysteine residue of 3rd and 20th disulfide-bonds, having the amino acid sequence of sequence number 1 which the 2 amino acid residue binded with N- terminal side from the 3rd cysteine residue, and the 5 amino acid each binded with C- terminal side from the 20th cysteine residue was confirmed.

[REFERENCE 2]

Peptide automatic-synthesis apparatus (made by the Pharmacia LKB biotechnology company.) The peptide which has the amino acid sequence of sequence number 1 based on the

ミカル・ソサイエティー・パーキン I (Journal of Chemical Society Perkin I)、第538頁、1981年]に基づいて配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するペプチドを次のようにして合成した。

solid-phase peptide synthesis method [journal of chemical society Perkin I (Journal of Chemical Society Perkin I), Page 538, 1981] by German shepherd etc. was synthesized as follows using LKBBiolynx4170.

【0031】

アミン官能基を9-フルオレニルメトキシカルボニル基で保護したアミノ酸 [以下 Fmoc-アミノ酸または Fmoc-固有のアミノ酸 (例えば、Fmoc-アスパラギン) と記載することがある] に、N, N-ジシクロヘキシルカルボジイミドを添加して所望のアミノ酸の無水物を生成させ、この Fmoc-アミノ酸無水物を合成に用いた。ペプチド鎖を製造するためにC-末端のフェニルアラニン残基に相当する Fmoc-フェニルアラニン無水物を、そのカルボキシル基を介し、ジメチルアミノピリジンを触媒としてウルトロシンA樹脂 (ファルマシア LKB バイオテクノロジー社製) に固定する。次いでこの樹脂をピペリジンを含むジメチルホルムアミドで洗浄し、C-末端アミノ酸のアミン官能基の保護基を除去する。のちアミノ酸配列のC-末端から2番目に相当する Fmoc-アラニン無水物を前記C-末端アミノ酸残基を介して樹脂に固定されたフェニルアラニンの脱保護アミン官能基にカップリングさせた。以下同様にして順次アルギニン、アルギニン、バリン、システイン、スレオニン、イ

[0031]

Amine functional group, to the amino acid protected by 9-fluorenyl methoxycarbonyl group [The following may describe as Fmoc- amino acid or intrinsic Fmoc-amino acid (for example, Fmoc- asparagine)], N,N- dicyclohexylcarbodiimide is added and the anhydride of a desired amino acid is produced. This Fmoc-amino acid anhydride was synthetically used.

In order to manufacture a peptide chain, about the Fmoc-phenylalanine anhydride which corresponds to the phenylalanine residue of C- terminal, it becomes like this via the carboxyl group. It fixes to Ultrosin "A" resin (made by the Pharmacia LKB biotechnology company) by setting a dimethylamino pyridine as a catalyst.

Subsequently, this resin is washed by the dimethylformamide which contains a piperidine, the protecting group of the amine functional group of C- terminal amino acid is removed. The de-protection amine functional group of the phenylalanine fixed to the resin via said C-terminal amino acid residue was made to couple the Fmoc-alanine anhydride which corresponds 2ndly from C- terminal of an after amino acid sequence.

ソロイシン、セリン、プロリン、アラニン、グリシン、ロイシン、リジン、リジン、メチオニン、アルギニン、トリプトファン、グルタミン、トリプトファン、アルギニン、アルギニン、システイン、リジンおよびフェニルアラニンを固定した。全部のアミノ酸のカップリングが終了し、所望のアミノ酸配列のペプチド鎖が形成された後、94% TFA、5% フェノール、および1% エタノールからなる溶媒でアセトアミドメチル以外の保護基の除去およびペプチドの脱離を行ない、高速液体クロマトグラフィーによりペプチドを精製し、この溶液を濃縮し、乾燥して、ペプチド粉末を得た。

【0032】

前記のペプチドについてアミノ酸分析計を用いて常法によりアミノ酸組成を分析し、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有することを確認した。

【0033】**【実施例】**

次に実施例を示してこの発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。

【実施例1】

参考例1と同一の方法で得たペプチ

Sequential arginine, arginine, valine, cysteine, a threonine, isoleucine, serine, a proline, alanine, glycine, leucine, lysine, lysine, methionine, arginine, tryptophan, glutamine, tryptophan, arginine, arginine, cysteine, lysine, and phenylalanine were fixed like the following.

Coupling of all amino acids is completed, after the peptide chain of a desired amino acid sequence is formed, TFA, 5% phenol, and the solvent that consists of ethanediol 1% perform the removal of protecting groups other than acetamide methyl, and desorption of peptide 94%, and a peptide is purified by a high-speed liquid chromatography, this solution is concentrated, it dries, the peptide powder was obtained.

[0032]

An amino acid composition is analyzed by a conventional method using an amino acid analyzer about said peptide, it confirmed having the amino acid sequence of sequence number 1.

[0033]**[EXAMPLES]**

Next, an Example is shown and this invention is demonstrated further in detail and concretely. This invention is not limited to the following examples.

[EXAMPLE 1]

Peptide 20 mg obtained by the same

ド 20 mg を、1000 ml の精製水に溶解し、溶液状のエンドトキシンによる炎症の抑止剤を得た。

【実施例 2】

参考例 2 と同一の方法で得たペプチド 50 mg およびメチルセルロース（和光純薬工業社製）5 g を 1000 ml の精製水に溶解し、溶液状のエンドトキシンによる炎症の抑止剤を得た。

【実施例 3】

参考例 1 と同一の方法で得たペプチド 30 mg およびエチルアルコール 200 ml を 800 ml の精製水に溶解し、溶液状のエンドトキシンによる炎症の抑止剤を得た。

【実施例 4】

100 ml 当たり次の組成の点眼薬を常法により製造した。

【0034】

ホウ酸	1.9 g
メチルセルロース（和光純薬工業社製）	0.5 g
参考例 1 と同一の方法で得たペプチド	1.0 mg
精製水	97.6 ml

実施例 5

method as Reference Example 1 is dissolved in a 1000 ml purified water, the suppressing agent of the inflammation by a solution-like endotoxin was obtained.

[EXAMPLE 2]

Peptide 50 mg and methyl-cellulose (made by Wako Purechemical Co., Ltd. company) 5g obtained by the same method as Reference Example 2 are dissolved in a 1000 ml purified water, the suppressing agent of the inflammation by a solution-like endotoxin was obtained.

[EXAMPLE 3]

Peptide 30 mg and ethyl alcohol 200 ml obtained by the same method as Reference Example 1 are dissolved in a 800 ml purified water, the suppressing agent of the inflammation by a solution-like endotoxin was obtained.

[EXAMPLE 4]

The eye drop of the following composition was manufactured by the conventional method per 100 ml.

[0034]

Boric acid	1.9g
Methyl cellulose (made by Wako Purechemical Co., Ltd. company)	0.5g
Peptide obtained by the same method as Reference Example 1	1.0 mg
Purified water	97.6 ml

Example 5

100g 当たり次の組成の皮膚用スプレーを常法により製造した。

The spray for the skins of the following composition was manufactured by the conventional method per 100g.

【0035】

プロピレングリコール（和光純薬工業社製） 0.4g
 エチルアルコール（和光純薬工業社製） 4.6g
 フレオン11（商標。デュポン社。トリクロロフルオロメタン） 30g
 フレオン12（商標。デュポン社。ジクロロジフルオロメタン） 48g
 ジエチルエーテル（和光純薬工業社製） 17g
 参考例1と同一の方法で得たペプチド 10mg

[0035]

Propylene glycol (made by a Wako Purechemical Co., Ltd. company) 0.4g
 Ethyl alcohol (made by a Wako Purechemical Co., Ltd. company) 4.6g
 Freon 11 (trademark, Du-Pont company, trichlorofluoromethane) 30g
 Freon 12 (trademark, Du-Pont company, dichlorodifluoromethane) 48g
 Diethyl ether (made by Wako Purechemical Co., Ltd. company) 17g
 Peptide obtained by the same method as Reference Example 1 10 mg

【0036】

【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この発明によって、ラクトフェリン由来で分子量10,000ダルトン以下のペプチドを有効成分とするエンドトキシンによる炎症の抑止剤が提供され、この発明によって次の効果が奏せられる。

1) この発明の有効成分であるペプチドは、免疫系細胞からのエンドトキシン誘導性サイトカインの放出、例えばヒト単球からのエンドトキシン刺激によるインターロイキン-6の放出を抑止する活性を有するので、エンドトキシンによる炎症の阻止に有効である。

[0036]

[ADVANTAGE OF THE INVENTION]

The suppressing agent of the inflammation by the endotoxin which contains the peptide of 10,000 or less Dalton of molecular weight as an active ingredient by the lactoferrin origin is provided by this invention as demonstrated in detail above, the following effect is showed by this invention.

1) The peptide which is the active ingredient of this invention has activity which restricts release of the endotoxin inducing cytokine from an immune-system cell, for example, release of the interleukin-6 by the endotoxin stimulation from a human monocyte.

2) このペプチドは、0.5 から 50 ppm の範囲の低濃度で効果を示す。

3) このペプチドは、グラム陰性菌感染時のヒトおよび動物におけるサイトカインを介する急性炎症、敗血症等のエンドトキシンによる有害な身体への作用を防止し、その治療に有効である。

Therefore, it is effective in prevention of the inflammation by an endotoxin.

2) This peptide shows effect by the low concentration of the range of 0.5 to 50 ppm.

3) This peptide prevents the effect to the harmful body by endotoxins which intervene the cytokine in the human and animal at the time of a Gram-negative-bacteria infection, such as acute inflammation and sepsis, it is effective in the treatment.

【図面の簡単な説明】

[BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS]

【図 1】

リポポリサッカライドの用量とインターロイキン-6 放出との関係を示す。

[FIG. 1]

The relationship between the dosage of a lipopolysaccharide and interleukin-6 release is shown.

【図 2】

リポポリサッカライドの用量とインターロイキン-6 放出との関係を示す。

[FIG. 2]

The relationship between the dosage of a lipopolysaccharide and interleukin-6 release is shown.

【図 3】

細菌細胞壁断片、細菌菌体および精製リポポリサッカライドの刺激前後のペプチドの添加によるインターロイキン-6 放出との関係を示す。

[FIG. 3]

A relationship with interleukin-6 release by the addition of the peptide of the stimulus before and after of a bacteria cell-wall fragment, bacteria microbial cells, and the purified lipopolysaccharide is shown.

【配列表】

[SEQUENCE TABLE]

配列番号 1

配列の長さ: 25

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

Sequence number 1

Sequence length: 25

Sequence type: Amino acid

Topology: Linear

Type of sequence: Peptide

配列:

Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg
Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro

1 5 10 15
Ser Ile Thr Cys Val Arg Arg Ala Phe
20 25

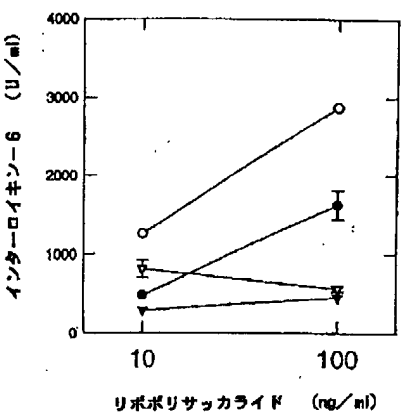
Sequence:

Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met
Lys Lys Leu Gly Ala Pro

1 5 10 15
Ser Ile Thr Cys Val Arg Arg Ala Phe
20 25

【図 1】

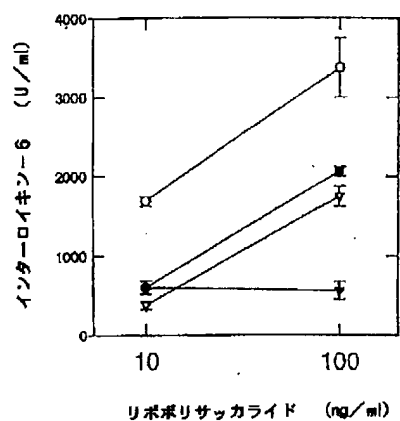
[FIG. 1]



Interleukin-6	Lipopolysaccharide
---------------	--------------------

【図 2】

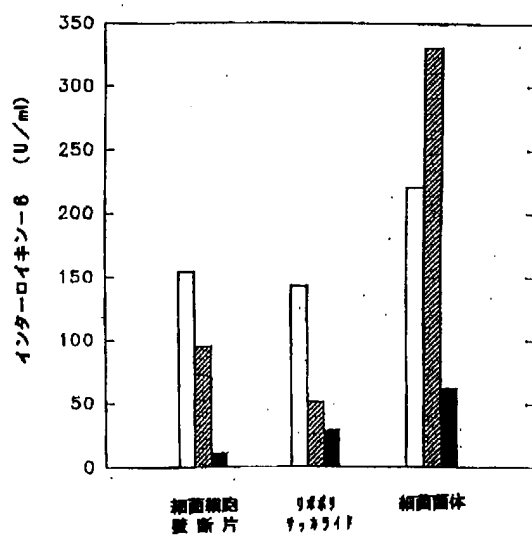
[FIG. 2]



Interleukin-6	Lipopolysaccharide
---------------	--------------------

【図 3】

[FIG. 3]



Interleukin-6		
Microbe Cell Wall Fragments	Lipopolysaccharide	Microbe bodies



THOMSON DERWENT TERMS AND CONDITIONS

Thomson Derwent shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Derwent translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.

Derwent Information Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our home page: ["THOMSONDERWENT.COM"](http://THOMSONDERWENT.COM) (English)
["WWW.DERWENT.CO.JP"](http://WWW.DERWENT.CO.JP) (Japanese)